



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원 번호 : 10-2004-0007237
Application Number

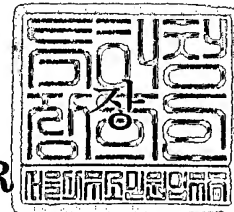
출원 년 월 일 : 2004년 02월 04일
Date of Application FEB 04, 2004

출원 인 : 박희경 외 1명
Applicant(s) PARK, HEE-KYUNG, et al.



2004 년 08 월 04 일

특 허 청
COMMISSIONER



**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【참조번호】	0018
【제출일자】	2004.02.04
【국제특허분류】	C07H
【발명의 명칭】	Q C 프로브를 포함하는 마이크로어레이 및 그 제조방법
【발명의 영문명칭】	Microarray comprising QC probes and method for fabricating the same
【출원인】	
【성명】	김철민
【출원인코드】	4-1999-034184-5
【출원인】	
【성명】	박희경
【출원인코드】	4-1999-034186-8
【대리인】	
【성명】	이영필
【대리인코드】	9-1998-000334-6
【대리인】	
【성명】	이해영
【대리인코드】	9-1999-000227-4
【발명자】	
【성명】	김철민
【출원인코드】	4-1999-034184-5
【발명자】	
【성명】	박희경
【출원인코드】	4-1999-034186-8
【발명자】	
【성명의 국문표기】	장현정
【성명의 영문표기】	JANG, Hyun Jung
【주민등록번호】	730415-2114238

【우편번호】	608-040
【주소】	부산광역시 남구 문현3동 395번지 삼성아파트 105동 1402호
【국적】	KR
【우선권주장】	
【출원국명】	KR
【출원종류】	특허
【출원번호】	10-2003-0006722
【출원일자】	2003.02.24
【증명서류】	첨부
【심사청구】	청구
【핵산염기 및 아미노산 서열목록】	
【서열개수】	10
【서열목록의 전자파일】	첨부
【취지】	특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인 이영필 (인) 대리인 이해영 (인)
【수수료】	
【기본출원료】	38 면 38,000 원
【가산출원료】	0 면 0 원
【우선권주장료】	1 건 26,000 원
【심사청구료】	16 항 621,000 원
【합계】	685,000 원
【감면사유】	개인 (70%감면)
【감면후 수수료】	223,700 원
【첨부서류】	1. 위임장_2통 2.우선권증명서류 원문_1통

【요약서】

【요약】

본 발명은 마이크로어레이의 품질검사용 QC 프로브, 상기 QC프로브와 표적프로브를 지지체에 고정하는 것을 특징으로 하는 마이크로어레이의 제조방법 및 상기 QC 프로브를 이용한 마이크로어레이의 품질검사 방법에 관한 것이다. 더욱 구체적으로는 형광물질로 표지된 QC 프로브와 표적 프로브를 일정 비율로 혼합하여 마이크로어레이의 지지체에 고정하여 마이크로어레이를 제조하는 방법, 상기 제조된 마이크로어레이를 이용하여 표적 프로브와 표적 산물과의 혼성화 반응 전 또는 후에 상기 형광물질에서 발생하는 형광신호를 스캐닝하여 프로브의 고정화 상태를 검증하는 것을 포함하는 마이크로어레이의 품질을 검사하는 방법 및 상기 마이크로어레이의 품질검사에 사용되는 QC 프로브에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 마이크로어레이의 지지체에 고정된 프로브 각각에 대한 고정화 여부와 고정화된 프로브의 모양과 농도 등에 대한 검증, 표적 프로브와 표적 산물의 결합 반응 또는 혼성화 반응에 대한 검증이 가능하다. 본 발명에 의한 QC 프로브를 함유하는 마이크로어레이를 혼성화 반응에 이용할 경우, 마이크로어레이를 이용한 실험 과정 및 결과 분석의 신뢰도를 증가시킬 수 있다. 또한, QC 기능이 포함된 표적 프로브 사용으로 마이크로어레이 제작과정이 더욱 간편화되었다.

【대표도】

도 2

【명세서】

【발명의 명칭】

Q C 프로브를 포함하는 마이크로어레이 및 그 제조방법{Microarray comprising QC probes and method for fabricating the same}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 프로브의 고정화 및 혼성화 반응에 대한 검증에 이용되는 QC 프로브의 디자인이다.

도 2는 QC 프로브와 표적 프로브를 혼합한 후 지지체에 고정시킨 프로브들의 그림이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예로서 표적 프로브 겸용 QC 프로브, 달리 말하면 QC 기능이 추가된 표적 프로브의 디자인이다.

도 4a 내지 4c는 QC 프로브와 표적 프로브를 일정 비율로 혼합하여 슬라이드에 고정시킨 후 슬라이드를 세척 전에 스캐너로 분석한 결과이고, 도 4d는 각 슬라이드에 스폿팅 된 표적 프로브의 배열에 관한 모식도이다.

도 5는 QC 프로브를 사용하지 않고 표적 프로브만을 슬라이드에 고정시킨 후, 슬라이드를 세척하기 전에 스캐너로 분석한 결과이다.

도 6a 내지 6c는 QC 프로브와 표적 프로브를 슬라이드에 고정시킨 후, 세척 후의 슬라이드를 스캐너로 분석한 결과이다. 1)은 세척 후, 혼성화 반응 전의 슬라이드를 스캐너로 분석한 결과이며, 2)는 혼성화 반응 후의 슬라이드를 분석한 그림이다. 도 6d는 각 슬라이드에 스폿팅된 표적 프로브의 배열에 관한 모식도이다.

도 7a 내지 7b은 표적 프로브의 스페이서 또는 표적 염기서열의 중간에 형광염료를 부가한 프로브에 대한 결과로서, 1)는 지지체에 고정시킨 후, 세척 후의 QC를 위해 표지한 TAMRA 파장 (532 nm)으로 분석한 결과이며, 2)는 혼성화 반응후 표적 산물과의 혼성화 여부를 분석한 결과이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<8> 본 발명은 형광표지된 QC(quality control) 프로브, 이를 포함하는 마이크로어레이의 제조방법 및 마이크로어레이에 포함된 QC 프로브를 이용하여 마이크로어레이의 품질을 검사하는 방법에 관한 것으로, 더욱 구체적으로는 형광물질로 표지된 품질 관리용 프로브 (이하, 'QC 프로브'로 표기함)와 표적 산물과 반응하는 프로브 (이하, '표적 프로브'로 표기함)를 일정 비율로 혼합하여 마이크로어레이의 지지체에 스팟팅하여 마이크로어레이를 제조하는 방법, 표적 프로브 염기서열 임의의 위치에 형광염료를 부가하여 표적프로브만으로 QC 기능까지 포함하는 표적 프로브를 제작하는 방법, 상기 제조된 마이크로어레이를 이용하여 표적 프로브와 표적 산물과의 혼성화 반응 전 또는 후에 상기 형광물질에서 발생하는 형광신호를 스캐닝하여 프로브의 고정화 상태를 검증하는 것을 포함하는 마이크로어레이의 품질검사방법 및 이에 사용되는 QC 프로브에 관한 것이다.

<9> 바이오칩(biochip)이란 유리, 실리콘, 혹은 나일론 등의 재질로 된 작은 기판 위에 디엔에디(DNA), 단백질 등의 생물분자(biomolecule)들을 고정화시켜 놓은

것을 말하며 이때 디엔에이를 고정화시켜 놓은 것을 디엔에이칩(DNA chip), 단백질을 고정화시켜 놓은 것을 단백질칩(protein chip)이라 명명한다. 또한 바이오칩은 마이크로어레이칩(microarray chip)과 마이크로플루이드칩(micro fluidics chip)으로 크게 나눌 수 있다. 마이크로어레이칩은 수천 또는 수 만개 이상의 디엔에이나 단백질 등을 일정 간격으로 배열하여 부착시키고, 분석 대상 물질을 처리하여 그 결합양상을 분석할 수 있는 바이오칩으로 디엔에이칩, 단백질칩 등이 대표적이다. 마이크로플루이드칩은 랩온어칩(Lab-on-a-chip)이라고도 하는데 미량의 분석 대상물질을 주입하여 칩에 고정화되어 있는 각종 생물분자 프로브 혹은 센서와 반응하는 양상을 분석할 수 있는 바이오칩이다. 디엔에이칩은 디엔에이를 칩 표면에 심는 방법에 따라 핀 마이크로어레이 칩(pin microarray chip), 잉크젯 칩(inkjet chip), 광석판 칩(photolithography chip) 및 전자적 어레이 칩(electronic array chip)으로 나눌 수 있다.

<10> 디엔에이칩은 고정화시키는 프로브의 종류에 따라 올리고뉴클레오티드칩(oligonucleotide chip)과 cDNA chip으로 구분할 수 있다. cDNA chip에는 500 염기쌍(base pair, bp) 크기의 프로브가 부착되어 있고 올리고뉴클레오티드칩에는 15~25개의 염기들로 이루어진 프로브가 부착되어있다. 올리고뉴클레오티드칩 기술은 대규모의 유전적 다양성을 조사할 수 있는 새로운 방법으로서 지지체의 아주 작은 공간의 정확한 위치에 다수의 합성 올리고뉴클레오티드를 부착시켜 아주 적은 양의 표적 염기서열과 혼성화 반응을 함으로서 동시에 많은 유전자를 검색할 수 있게 되었다. 이러한 올리고뉴클레오티드칩은 돌연변이 검색, 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP), 질병 진단 또는 유전자 발현 청사진을 만드는 데 많은 기여를 할 것으로 기대된다 (박순규, 이민기, 정병선, 김철민, 장철훈, 박희경, 장현정, 박승규 및 송선대. Oligonucleotide chip을 이용한 rifampin 내성 결핵균의 rpoB 유전자 돌연변이 검출. 결핵 및 호흡기질환, 49(5): 546-557(2000)). cDNA chip은 Northern blot의 역

실험(Reverse Northern)이라고 할 수 있다. 즉, cDNA 클론(clone) 등의 유전자 프로브를 표면의 특수 처리된 유리나 나일론 멤브레인(nylon membrane) 등의 지지체에 고농도로 붙여서 칩을 제조한 후 연구하고자 하는 유전자의 mRNA(messenger RNA)로부터 얻은 역전사효소-중합연쇄반응(RT-PCR) 산물이나 유전자 자체를 혼성화 시켜서 Cy3와 Cy5 등의 형광 물질로 검출, 분석한다. cDNA chip은 게놈 프로젝트(genome project)의 결과로 알려진 수많은 유전자의 발현정도, 암 발생의 원인 규명 및 치료방법 개발, 약물 투여의 효과 연구, 신약 개발, 노화나 각종 질병의 원인 규명 및 치료 방법 개발 등에도 널리 이용되게 되었다 (조연규, 양병환, 한진희. c-DNA microarray와 정신의학, 유전정신의학연구회, 2001).

<11> 단백질칩은 특정 단백질과 반응할 수 있는 수십에서 수백 종류 이상의 서로 다른 단백질이나 리간드(ligand) 등을 지지체에 집적시킨 후, 이들과 특이적으로 상호 반응하는 생체분자의 존재, 또는 기능 및 역할을 형광, 질량분석기 등의 여러 가지 분석 방법을 이용하여 대량으로 신속하게 분석하는 장치를 의미한다. 단백질이 평면상에 단순히 배열된 항체 어레이(antibody array), 펩티드 어레이(peptide array), 단백질 어레이(protein array)에서부터 치료전처리 기능이 구현된 마이크로플루이딕 단백질칩까지 포함하는 기술을 총괄적으로 단백질칩이라 정의한다. 단백질칩은 고체표면에 단백질을 어레이화 시킬 때 일반적으로 디엔에이칩 제조 시와 유사한 자동화된 마이크로어레이를 사용한다. 잉크젯프린팅에 의해서도 단백질 어레이를 제조할 수 있다.

<12> 바이오칩은 지지체의 표면에 올리고뉴클레오타이드, cDNA, 단백질 등의 유전 정보를 포함하는 프로브를 고정시키고, 시료 속의 DNA나 cDNA, 또는 PCR로 증폭된 DNA 등에 형광물질을 부착시켜 혼성화 반응에 의해 상보적인 서열을 가진 프로브에만 결합하게 하여 그 결합 양상을 정성 및 정량적으로 분석하는 방법이다 (Duggan D.J., Bittner M., Chen Y., Meltzer P. and

Trent J.M., Expression profiling using cDNA microarrays, Nat. Genet. Supp. 21:10-14, 1999, Vivian G. Cheung, M. Morley, F. Aguilar, A. Massimi, R. Kucherlapati, G. Childs, Nature genetics, 1999, 21: 15-19). 다양한 지지체 위의 올리고뉴클레오티드 등을 포함하는 프로브의 고정 여부와 농도가 표적 산물과 표적 프로브의 혼성화 반응 양상 등의 결과에 미치는 영향이 크다. 그러므로 프로브(스팟)의 고정화 여부와 농도에 대한 검증이 아주 중요하다. 또한, 모든 표적 프로브가 고정되어 있는지 검증하지 않은 상태에서의 혼성화 반응은 표적 프로브와 표적 산물의 결합 양상의 정성 및 정량적 분석 결과에 상당한 영향을 미친다.

<13> 바이오칩은 제조된 표적 프로브의 스폿터(spotter)를 이용한 지지체에 집적시키는 과정, 표적 산물과 표적 프로브의 혼성화 반응 과정 및 스캐너를 통한 분석 과정을 거치게 된다. 이러한 과정을 거치는 각 칩을 수공으로(manually) 검사하기에는 불가능하기 때문에 많은 수의 마이크로어레이 요소들(elements)의 품질관리(quality control)는 마이크로어레이 제조에 매우 중요하다 (V. Chizhikov, M. Wagner, A. Ivshina, Y. Hoshino, A. Z. Kapikian, and K. Chumakov, Detection and genotyping of human group A Rotaviruses by oligonucleotide microarray hybridization, Journal of Clinical Microbiology, 40(7):2398-2407, 2002).

<14> 따라서, 마이크로어레이의 결과 분석에 대한 신뢰도를 높이기 위해 혼성화 반응 전에 마이크로어레이의 품질을 확인할 필요성이 있다. 스탠포드 대학의 Brown 등은 유리표면에 스폿팅 되는 DNA 프로브와 함께 존재하는 염에 의해 산란되는 것을 레이저 스캐너에 의하여 포착하여 DNA 프로브 스폿팅의 균일성과 유리표면의 손상 유무를 검사하는 방법을 개발하였다. 그러나, 이 방법은 스폿팅 직후에만 DNA 스폿을 검사할 수 있으며 고정화와 세척이후에는 DNA 스폿에 존재하는 염이 제거되므로 DNA 칩 제조가 끝난 후의 DNA 스폿의 질(quality)을 검사할 수 없는 문제점이 있다.

<15> 최근에는, 마이크로어레이 제조를 위한 품질관리방법으로 단일가닥 디엔에이 (single-stranded DNA)에 대한 특이적 친화력으로 형광을 나타내는 사이버그린 II(SYBR green II) 등의 염료를 사용하여 마이크로어레이에 염색한 후, 레이저 스캐너로 분석하고 있다. 이러한 방법은 마이크로어레이의 지지체 표면, 완전한 상태(integrity)와 각 스팟의 동질성 (homogeneity) 등의 품질 평가에 이용되고 있다 (Battaglia C, Salani G, Consolandi C, Bernardi LR, and De Bellis G., Analysis of DNA microarrays by non-destructive fluorescent staining using SYBR green II, Biotechniques 29(1):78-81, 2000). 그러나, 이 방법은 본 실험의 혼성화 반응에 사용하기 위해 형광 염료를 완전히 제거하는 번거로운 과정을 거쳐야 되나, 본 발명의 방법은 단지 본 실험에 들어가기 전에 스캐닝 과정만으로 품질 확인이 가능하다. 또한, 사이버그린(SYBR green II) 등으로 품질 관리에 사용된 마이크로어레이는 결과 확인 후 재사용이 가능하다고 보고되고 있으나 재사용이 혼성화 반응의 효율이 12% 이상 저하되어 제품의 효능이 저하되므로 비효율적이다.

<16> 또한, 마이크로칩 제조(fabrication)과 혼성화 반응 과정의 품질 관리를 위해 지지체 위에 표적 프로브와 참고 올리고뉴클레오티드 QC 프로브(reference oligonucleotide QC probe)를 함께 고정화하지만 혼성화 반응을 거쳐야하고, 혼성화 반응 실험에 QC 프로브에 상보적이며 표적 프로브와는 다른 파장을 가지는 형광물질로 표지화된 합성 올리고뉴클레오티드를 표적 산물과 혼합하여 반응시키고, 혼성화 반응 후 두 가지의 서로 다른 파장을 이용하여 혼성화 반응 후에 표적 프로브 및 참고 올리고뉴클레오티드의 분포에 대한 정보를 얻을 수 있다 (V. Chizhikov, M. Wagner, A. Ivshina, Y. Hoshino, A. Z. Kapikian, and K. Chumakov, Detection and genotyping of human group A Rotaviruses by oligonucleotide microarray hybridization, Journal of Clinical Microbiology, 40(7):2398-2407, 2002). 그러나, 이 방법은 생산된 마이

크로어레이를 염색 및 혼성화 반응 등의 실험 과정을 거친 후에야 품질 관리가 가능하다는 문제점이 있다. 또한 각각의 마이크로어레이에 대한 정확한 품질 관리가 불가능하며, 본 실험과 동일한 실험과정을 거치는 등의 시간적인 면과 노동력 면에서 비효율적인 방법이다.

<17> 이에, 본 발명자들은 기존의 마이크로어레이 제조 시의 품질관리방법이 가지고 있는 단점과 비효율성을 개선하기 위하여 예의 노력한 결과, 표적 프로브와 형광이 표지된 QC 프로브를 혼합하여 스왑팅하거나 표적 프로브에 형광염료를 부가하여 QC기능이 포함된 표적 프로브만을 스왑팅한 후 혼성화 반응 전에 스캐너로 슬라이드에 스왑팅된 각 프로브에 대하여 품질 확인 후 본 실험에 사용하면 마이크로어레이의 경제적이고 신속·정확한 품질검사가 가능함을 발견하고 본 발명을 완성하게 되었다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<18> 따라서, 본 발명의 목적은 형광표지된 QC 프로브를 함유하여 품질검사가 용이한 새로운 마이크로어레이의 제조방법을 제공하는데 있다.

<19> 본 발명의 또 다른 목적은 상기 제조된 마이크로 어레이에 함유된 QC 프로브를 이용하여 마이크로어레이의 프로브 고정화뿐만 아니라 표적산물과의 결합 (이하, '혼성화'와 병용함) 반응의 품질을 확인할 수 있는 경제적이고 신속·정확한 마이크로어레이의 품질을 검사하는 방법을 제공하는데 있다.

【발명의 구성 및 작용】

<20> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 표적 산물의 염기서열과 서로 상보적인 서열을 가지거나 또는 임의의 염기서열을 가지는 올리고뉴클레오타이드에 형광물질을 표지하되, 상기

형광물질은 표적 산물에 표지된 형광물질과는 다른 여기/방출(excitation/emission) 파장을 가지는 것임을 특징으로 하는, 마이크로어레이의 품질검사 용 QC 프로브를 제공한다.

<21> 본 발명에서, QC 프로브에 표지된 형광물질은 표적 산물에 표지된 형광물질과는 다른 여기/방출(excitation/emission) 파장을 가지는 것을 특징으로 한다. 이로써, 진단이나 연구용 등의 본 실험 전에 마이크로어레이를 특정한 파장의 형광물질로 표지된 QC 프로브를 분석함으로써 집적된 프로브에 대한 검증을 한 후에도, 본 실험에서 상호 간섭(spectral interference) 없이 지지체에 부착된 프로브와 혼성화 반응에 대한 검증을 할 수 있다.

<22> 본 발명에서, QC 프로브에 표지된 형광물질은 하기 표 1에 나열된 물질 중에서 선택된 어느 1종 이상의 물질을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않고 표적 산물과 다른 파장을 갖는 어느 형광물질도 사용할 수 있다. 예를 들어, 표적 산물과 표적 프로브의 결합 반응 유무를 확인하기 위해 Cy5 형광물질을 사용하는 경우, QC 프로브는 Cy3 또는 TAMRA 등의 다른 파장의 형광 물질을 이용할 수 있다.

<23> [표 1] 마이크로어레이 제조 시 품질 관리에 사용 가능한 형광물질.

형광물질	Excitation (nm)	Emission (nm)	Emission filter
Pyrene	340	376, 395	430
Cyanine 2	489	506	508
GFP	488	507	508
Calcein	494	517	522
FITC	494	518	522
Alexa 488	490	520	522
FAM	490	520	522
Fluorescein Chlorotriazinyl	492	514	522
Fluorescein	494	517	522
Rhodamine 110	500	525	522
Oregon Green	500	524	522
Magnesium Green	506	531	530
Calcium Green	506	533	530
JOE	524	550	549
Cyanine 3	550	570	570
Tetramethylrhodamine	550	570	570
TRITC	547	572	570
TAMRA	560	582	578
Rhodamine Phalloidin	550	575	578
Pyronin Y	555	580	578
Lissamine	570	590	592
ROX	588	608	614
Calcium Crimson	590	615	614
Texas Red	595	615	614
Nile Red	549	628	630
Cyanine 5	649	670	670
Thiadicarbocyanine	651	671	670

<24> 본 발명에서, QC 프로브는 기존의 일반 지지체에 부착된 프로브와 같이 표적 산물의 염기서열과 서로 상보적인 서열을 가지거나 임의의 염기서열을 가지는 올리고뉴클레오타이드일 수 있다. 이때, 형광물질은 상기 올리고뉴클레오타이드의 염기 서열중 하나 또는 그 이상의 자리에 표지될 수 있으며, 그 위치는 QC 프로브의 3' 말단, 5' 말단 또는 중간 등 프로브의 어떠한 위치에도 표지가 가능하다.

<25> 본 발명에서, QC 프로브는 프로브의 염기서열과 형광물질 사이에 스페이스(spacer)를 두거나 두지 않을 수도 있다. 이때 스페이스는 혼성화에 영향을 주지 않고 형광물질과 프로브를 연결(link)할 수 있는 어떤 분자도 가능하며, 예컨대 C-3 linker, C-6 linker, C-6 TFA

linker, C-5 amino modifier, C-12 linker, Amino dT C2 linker, Amino dT C6 linker, 3' branched amino CPGs, 3' C3 amino modifier, 3' C7 amino modifier, 5' Thiol C-2 linker, 5' Thiol C-6 linker, 5' Thiol C-6 S-S, 3' Thiol C3 등을 포함할 수 있다. 또한 QC 프로브는 프로브와 지지체 사이에도 스페이서를 두거나 두지 않을 수 있는데, 이때 스페이서는 혼성화에 영향을 주지 않고 프로브와 지지체를 연결할 수 있는 어떤 분자도 가능하며, 예컨대 C-3 linker, C-6 linker, C-6 TFA linker, C-5 amino modifier, C-12 linker, Amino dT C2 linker, Amino dT C6 linker, 3' branched amino CPGs, 3' C3 amino modifier, 3' C7 amino modifier, 5' Thiol C-2 linker, 5' Thiol C-6 linker, 5' Thiol C-6 S-S, 3' Thiol C3 등을 포함할 수 있다.

<26> 본 발명에서, QC 프로브는 QC 프로브를 별도로 사용하지 않고 표적 프로브 또는 그 일부에 표적 산물과 다른 형광물질을 붙여 사용할 수도 있다. 이 경우, QC 프로브는 표적 산물의 염기서열과 서로 상보적인 서열을 가지는 올리고뉴클레오타이드(즉, 표적 프로브)의 염기 서열 및 스페이서 염기 중 하나 또는 그 이상의 자리에 형광물질이 표지되어 표적 프로브의 기능을 함께 가지는 것을 특징으로 한다. 즉, 하나의 프로브로 프로브의 고정화 상태 및 표적 산물과 표적 프로브의 혼성화 반응의 검증을 함께 수행할 수 있다.

<27> 상기 표적 프로브 겸용 QC 프로브에서, 형광물질 표지의 위치는 표적 프로브의 3' 말단, 5' 말단 또는 중간일 수 있으며, 바람직하게는 표적 프로브의 스페이서 또는 표적 염기서열의 중간에 형광물질이 표지된 것을 특징으로 한다.

<28> 상기 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 형광물질로 표지된 QC 프로브

와 표적 프로브를 일정 비율로 혼합하거나 표적 프로브 기능까지 포함한 QC 프로브(달리 말하면, QC 기능을 포함한 표적 프로브)를 단독으로 마이크로어레이의 지지체에 고정하는 것을 특징으로 하는 마이크로어레이의 제조방법 및 상기 방법에 의해 제조되고 형광물질로 표지된 QC 프로브를 함유하는 마이크로어레이를 제공한다.

<29> 본 발명은 또한 상기 형광물질로 표지된 QC 프로브를 함유하는 마이크로어레이를 이용하여 표적 프로브와 표적 산물과의 혼성화 반응 전에 상기 형광물질에서 발생하는 형광신호를 스캐닝하여 프로브의 고정화 상태를 검증하는 것을 포함하는 마이크로어레이의 품질을 검사하는 방법을 제공한다.

<30> 본 발명은 마이크로어레이 각각의 스팟에 대한 품질검사 및 이들 품질검사를 마친 마이크로어레이를 본 실험에 사용함으로써 표적 프로브와 표적 산물에 대한 결합 양상의 정확한 정성적 및 정량적 분석 결과를 얻을 수 있어 결국, 경제적이고 신속·정확한 마이크로어레이의 품질검사 방법을 제공한다.

<31> 기존의 지지체에 부착된 프로브를 이용한 혼성화 반응에서 프로브는 단지 표적 염기서열과 서로 상보적인 서열을 가지도록 고안되었으나, 본 발명에서는 실험하고자 하는 표적 프로브와 형광물질을 부착한 QC 프로브를 동시에 제공함으로써 혼성화 반응뿐만 아니라, 지지체 표면에 고정화된 프로브의 고정화 상태와 스팟팅 과정상의 문제점 여부를 신속·정확하게 검증할 수 있다.

<32> 본 발명에서, 프로브는 마이크로어레이의 종류에 따라 cDNA, 올리고뉴클레오티드, 펩타이드 또는 단백질 등과 같은 어떤 바이오 물질도 될 수 있다. 지지체는 마이크로어레이 제조에 통상적으로 사용되는 유리, 멤브레인, 금(gold), 젤피복 표면(gel-covered surface), 반도체 칩(semiconductive chip), 실리콘(silicon), 폴리머(polymer) 등을 포함하나, 이에 한정되지는

않는다. 지지체 표면은 silanization과 polymer matrix 등으로 코팅될 수 있으며, 형광 신호는 레이저 스캐너(laser scanner)나 CCD 스캐너(CCD scanner) 등에 의해 검출될 수 있다.

<33> 본 발명에서, 마이크로어레이는 지지체 위 각각의 스팟에 표적 프로브와 형광물질이 표지된 QC 프로브를 함께 혼합하거나 표적 프로브 기능까지 포함한 QC 프로브(달리 말하면, QC 기능을 포함한 표적 프로브)를 단독으로 포함하는 것을 특징으로 한다. 이로써, 마이크로어레이 제조 시에 프로브의 고정화와 관련하여 모든 마이크로어레이 각각의 프로브에 대한 신속·정확한 품질을 검사할 수 있다. QC 프로브를 표적 프로브와 혼합하여 이용하는 경우, QC 프로브와 표적 프로브는 비율에는 제한 없이 목적에 따라 다양하게 혼합될 수 있다. 다만, 형광이 표지된 QC 프로브의 농도가 높을수록 표적 프로브와 혼성화 반응을 하는 표적 염기서열에 부착되어 있는 형광의 세기를 간접할 수 있고, 또한 형광물질이 표지된 QC 프로브를 높은 농도로 사용하면 제조비가 높아지므로 형광물질이 표지된 QC 프로브의 농도는 가능한 낮은 것이 바람직하다. 또한, 표적 프로브 겸용 QC 프로브만을 단독으로 사용하는 경우, 표적 프로브에 형광염료를 표지하여 하나의 프로브로 혼성화를 위한 표적 프로브의 역할 및 품질 관리를 위한 QC 프로브의 역할을 동시에 수행할 수 있다.

<34> 상기 또 다른 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 상기 QC 프로브를 표적 프로브와 하나의 스팟에 함유하는 것을 특징으로 하는 마이크로어레이를 제공한다.

<35> 본 발명에서, 마이크로어레이는 그 용도에 따라 서로 다른 표적 프로브를 함유할 수 있으며, 상기와 같은 QC 프로브에 의해 프로브의 고정화 여부와 스팟 모양, 농도 등의 상태 검증 및 표적 산물과의 혼성화 반응 과정에 대한 검증을 할 수 있다.

<36> 이하, 마이코박테리아 균주 감별용 마이크로어레이를 이용한 하기 실시 예에 의거하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 그러나, 이들 실시 예는 본 발명에 대한 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 어떤 의미로든 본 발명의 범위가 이들 실시 예로 한정되는 것은 아니다.

<37> 실시 예 1 : 마이코박테리아 균주의 제놈 DNA 분리

<38> 마이코박테리아 표준 균주는 유전자은행(Korean Collection for Type Culture, KCTC)과 ATCC(American Type Culture Collection)에서 확보하였으며 이들의 DNA를 추출하기 위해서는 인스타진 매트릭스(InstaGene matrix, Bio-Rad Co., USA)를 사용하였다.

<39> 본 실험에 사용할 균주를 고체 배지(Ogawa 배지)에서 배양한 후 1 백금이를 따서 1.5 ml 튜브에 인스타진 매트릭스 200 μ l가 들어 있는 튜브에 넣어 부유시켰다. 이것을 56 °C에서 30 분 동안 반응시킨 후 10 초 동안 잘 혼합되도록 섞고, 다시 100 °C에서 8 분 동안 열처리한 후 10 초 동안 잘 섞었다. 혼합물을 12,000 rpm에서 3분 동안 원심분리하여 분리된 상층액을 새로운 튜브에 옮겼다. 이를 PCR 반응의 주형 DNA로 사용하였다.

<40> 사용된 표준 균주는 다음과 같다:

<41> 마이코박테리움 투베르쿨로시스(*M. tuberculosis*) H37Rv (ATCC 27294)

<42> 마이코박테리움 포튜이툼(*M. fortuitum*) (ATCC 6841)

<43> 마이코박테리움 아비움(*M. avium*) (ATCC 25291)

<44> 마이코박테리움 인트라셀룰라(*M. intracellulare*) (ATCC 13950)

<45> 마이코박테리움 칸사시(*M. kansasii*) (ATCC 12478)

<46> 마이코박테리움 첼로네(*M. chelonae*) (ATCC 35752)

<47> 마이코박테리움 엠서수스(*M. abscessus*) (ATCC 19977)

- <48> 마이코박테리움 고도네(*M. gordonae*) (ATCC 14470)
- <49> 마이코박테리움 베체(*M. vaccae*) (ATCC 15483)
- <50> 마이코박테리움 제노피(*M. xenopi*) (ATCC 19250)
- <51> 마이코박테리움 스메그마티스(*M. smegmatis*) (ATCC 21701)
- <52> 마이코박테리움 제네벤스(*M. genavense*) (ATCC 51233)
- <53> 마이코박테리움 말모엔스(*M. malmoense*) (ATCC 29571)
- <54> 마이코박테리움 시미에(*M. simiae*) (ATCC 25275)
- <55> 마이코박테리움 마리넘(*M. marinum*) (ATCC 927)
- <56> 마이코박테리움 울세란스(*M. ulcerans*) (ATCC 19423)
- <57> 마이코박테리움 가스트리(*M. gastri*) (ATCC 15754)
- <58> 마이코박테리움 테레(*M. terrae*) (ATCC 15755)

<59> 실시 예 2 : 마이코박테리아의 균주 감별을 위한 표적 프로브

- <60> 본 발명에 사용된 올리고뉴클레오티드 프로브는 퍼킨-엘머 DNA 합성기(Perkin Elmer DNA Synthesis, USA)를 사용해 5' 말단에 5'-Amino-Modifier C6-15개의 염기를 갖는 길이의 dT 스페이서 및 15-25개의 염기서열을 갖는 프로브를 합성하여 PAGE 정제하여 제조하였다 ((주)에스제이하이테크, 김철민, 박희경, 마이코박테리아의 균주 감별, 결핵균의 스트레인 감별과 항생제 내성을 검출하기 위한 프로브를 포함하는 마이크로어레이와 이를 이용한 검출 방법 및 진단 키트, 대한민국, 특허출원 2001-0062125호, 2001. 10. 09.). 본 발명에서 제조된 프로브는 아래 표 2와 같다.

- <61> [표2] 표적 프로브의 염기서열

<62>

동정 균주	프로브 이름	염기서열	서열번호
마이코박테리아 (<i>Mycobacteria</i>)	ITSF-2	GCTTTCTAAGGAGCACCACG	1
	ITSF-3	GCTTTCTAAGGAGCACCATT	2
	Mycom2R	TGGATAGTGGTTGCGAGCAT	3
TB complex	MTB-02	TGGTGGGGCGTAGGCCGTGA	4
<i>M. avium</i> - <i>M. intracellulare</i> (MAC)	MAC-03	CTCGGTCGAACCGTG	5
<i>M. fortuitum</i>	FOR-04	CAAACCTTTTGTACTGCCAG	6
<i>M. chelonae</i>	CHE-04	GTAGTCGGCAAAACGTCGGA	7
Internal control	INT-01	CAGTTATATGGATGATG	8

<63> 실시 예 3 : 형광 염료로 표지된 QC 프로브 제조

<64> QC 프로브에 표지된 형광물질은 표적 프로브에 이용하는 형광물질과는 파장이 다른 물질을 선택한다. 예로 올리고뉴클레오티드칩에서 표적 산물과 표적 프로브의 결합 반응을 확인하기 위한 형광물질을 670nm의 emission filter를 사용하는 Cy5를 선택한 경우, 품질검사를 위한 QC 프로브에 표지되는 형광물질은 570nm 대의 파장을 갖는 Cy3 또는 TAMRA 등 본 실험의 표적 산물과 표적 프로브의 염색에 사용하는 형광물질과 다른 파장을 갖는 형광물질을 합성에 이용한다. cDNA chip의 경우, Cy3와 Cy5를 표적 프로브에 이용하는 경우, 이들과 다른 제3의 파장을 갖는 형광물질을 품질검사를 위한 QC 프로브 합성에 이용한다.

<65> 실시 예는 표적산물의 염색을 위해 Cy5 형광물질을 이용하였고, QC 프로브 제조에는 TMARA(tetramethylrhodamine) 형광물질을 이용하여 5'-Amino-Modifier C6 20~50 mer-TAMRA QC 프로브를 고안하였고, 본 실험에서 사용한 QC 프로브의 염기서열은 다음과 같다.

<66> 5'-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT-TAMRA-3' (서열번호 9)

<67> 5'-TTT TTT TTT TTT TTT Tgg Tgg ggT gTg gTg TTT gA-TAMRA-3' (서열번호 10)

<68> 도 1에서 보듯이, QC 프로브는 지지체 위에 spacer를 두고 그 위에 각각의 표적 프로브와 동일한 염기서열 또는 임의의 염기서열을 두고 그 위에 직접 형광물질을 가지는 프로브와 염기서열과 형광물질 사이에 spacer를 두는 프로브를 사용할 수 있다.

<69> 실시 예 4 : 지지체에 프로브 부착

<70> 각각 실시 예 2에서 제조된 표적 프로브를 각각 30~50 pmol로 희석하여 96-well microplates에 분주하고 각 well에 1~5 pmol로 희석된 QC 프로브(실시 예 3에서 제조) 및 Micro-spotting 용액 또는 3×SSC 용액을 첨가하여 잘 혼합하였다. 본 실험에서는 QC 프로브 1 pmol과 표적 프로브 30 pmol을 혼합하였으나, 혼합비율은 결과 판독에 영향을 미치지 않을 선에서 얼마든지 변경이 가능하다. 슬라이드 글라스 또는 멤브레인(membrane) 등의 지지체에 혼합된 프로브를 마이크로어레이어(Cartesian Technologies, PLXSYS 7500 SQXL Microarrayer, USA)를 이용하여 도 2와 같이 프로브를 부착하였다. 한 종류의 프로브 당 두 개의 점(spot)을 지지체에 부착시킨 후, 실온의 슬라이드 박스에서 24시간 정도 정치 또는 50℃의 건조기(dry oven)에 약 5시간 방치하여 지지체 위의 표면에 고정시켰다.

<71> 실시 예 5 : 표적 산물 준비

<72> 마이코박테리아 균주 감별을 위한 표적 산물의 증폭을 위해 각각 바이오틴이 표지화된 프라이머를 사용하여 실시예 1에서 분리된 균주의 표적 부위 300~500 bp를 PCR 기법을 실시하여 선택적으로 증폭하였다. 본 실험에서는 ITSF-2, ITSF-3 및 Mycom2R의 바이오틴 프라이머를 사용하였다.

<73> PCR은 퍼킨-엘머 시터스 써모사이클러 모델 9600 (Perkin-Elmer Cetus Thermocycler Model 9600)에서 충분히 변성시키기 위해 94 ℃에서 3 분간 열처리한 후 94 ℃에서 1 분, 62

℃에서 1 분, 72 ℃에서 1 분씩 30 회 반응시킨 후, 마지막으로 72 ℃에서 10 분간 연장하였다. 이 방법은 인용 문헌으로 제시하고 있는 Park H.K. 등에 의한 문헌 J. Clin. Microbiol. 38: 4080-4085(2000)에 상세히 기재되어 있다.

<74> 실시 예 6 : 프로브의 고정화에 대한 품질 관리 조사

<75> 세척 전의 슬라이드에서 집적 과정상에서의 프로브 고정화 및 상태 여부도 결과 분석에 중요하고, 혼성화 및 결과 해석에는 세척 전과 후가 모두 영향을 줄 수 있으므로 세척 전의 상태를 확인하였다.

<76> 실시 예 4에서 제조된 마이크로어레이를 레이저 스캐너(laser scanner)를 이용하여 도 3 과 도 4와 같이 프로브를 고정화하여 세척하기 전의 슬라이드에서 프로브의 고정화 여부와 스팟의 상태를 분석하였다.

<77> 실시 예 7 : 고정화되지 않은 프로브 세척

<78> 실시 예 4 또는 실시 예 5의 과정을 마친 슬라이드에 고정화되지 않은 프로브를 세척하기 위하여 실시하였다. 실온에서 0.2% SDS 완충액을 이용하여 세척한 후, dH₂O를 이용하여 2회 세척하였다. 다음 sodium borohydride 용액에 5분간 방치한 후, 100 ℃에서 세척하였다. 마지막으로 다시, 0.2% SDS와 dH₂O를 이용하여 세척한 후, 원심분리기를 이용하여 슬라이드를 완전하게 건조시켰다. 과정을 마친 후, 세척 상태를 확인하기 위해 도 5의 1)과 같이 스캐너로 프로브 상태를 분석할 수 있다.

<79> 실시 예 8 : 혼성화 반응 (Hybridization)

<80> 실시 예 5에서 제조된 바이오틴으로 표지화된 표적 산물을 열처리하여 단일 가닥으로 변성시킨 후, 4℃로 냉각시켰다. 1~5 μ l의 표적 산물을 포함하는 혼성화 반응 용액 10 μ l를 제

조하였다. 실시 예 7을 마친 슬라이드에 혼성화 반응 용액을 분주하고 기포가 생기지 않도록 커버 슬립을 덮은 뒤 빛을 차단한 후, 40℃에서 30분간 반응시켰다.

<81> 실시 예 9 : 결합되지 않은 표적 산물의 세척

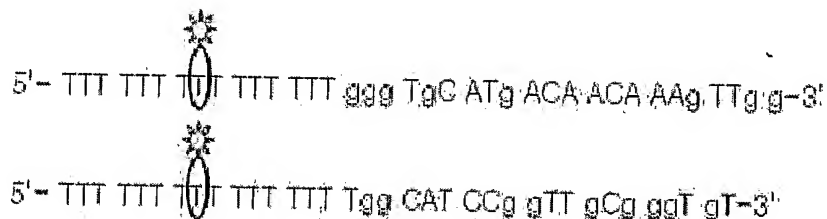
<82> 혼성화 반응을 하지 않은 잔여의 표적 산물을 세척하기 위해 2×SSC(300mM NaCl, 30mM Na-Citrate, pH 7.0)와 0.2% SDS를 혼합한 세척 용액을 이용하여 커버 슬립을 제거한 후에 2×SSC/ 0.2% SDS와 2×SSC, 그리고 0.2×SSC 용액 순으로 슬라이드를 세척하였다. 마지막으로 원심분리기를 이용하여 세척한 슬라이드를 완전하게 건조시켰다.

<83> 실시 예 10 : 염료 결합 및 분석

<84> 표적 산물과 표적 프로브와의 결합 유무를 확인하기 위해, Cy5-streptavidin 또는 Cy3-streptavidin(Amersham Pharmacia Biotech, USA)을 6×SSC와 BSA(Bovine Serum Albumin)를 이용하여 희석한 후 약 40 μ l를 슬라이드에 분주하여 커버 슬립을 덮고 빛을 차단한 후 50℃에서 약 20분간 반응시켰다. 실시 예에서는 표적 산물과 표적 프로브의 결합 반응 확인을 위해 Cy5-streptavidin을 염료를 이용하므로 QC 프로브의 형광 표지를 위해 Cy3와 같은 파장인 TAMRA 형광물질을 이용하였다. 실시 예 3에서 언급한 것처럼, 결합유무를 확인하기 위한 형광 물질과 다른 파장의 어떠한 형광물질도 QC 프로브에 표지화할 수 있다. 반응 후 슬라이드를 2×SSC 세척 용액을 이용하여 커버 슬립을 제거한 후, 2×SSC, 그리고 0.2×SSC 용액을 사용하여 세척하였다. 결합 반응 분석을 위해 레이저 스캐너(laser scanner)인 GenePix 4000A(Axon Instruments, USA)를 이용하여 도 5의 2)와 같이 결과를 분석하였다.

<85> 실시 예 11 : 표적 프로브 겸용 QC 프로브의 제조

<87>



<89>

34-22

프로브에 대한 고정화 여부 및 이물질과 환경 요인 등에 대한 프로브의 상태를 확인할 수 있다.

<90> 도 3은 표적 프로브 겸용 QC 프로브, 달리 말하면 QC 기능이 부가된 표적 프로브의 디자인으로, 지지체 위에 spacer를 두고 그 위에 각 표적 프로브의 염기서열을 두고 형광물질을 상기 spacer나 표적프로브 염기서열의 중간에 위치하도록 한 QC 프로브를 디자인한 그림이다.

<91> 도 4은 QC 프로브와 표적 프로브를 일정 비율로 혼합하여 슬라이드에 고정시킨 후 슬라이드를 세척 전에 스캐너로 분석한 결과로서, 지지체 위 프로브의 실제 고정화 여부 및 상태를 확인하기 위한 것이다. 스팟의 모양 및 크기가 대부분 동일하지만 지지체에 따라 스팟이 크거나 작음을 알 수 있다. 도 4a는 슬라이드에 고정시킨 프로브의 모양 및 농도 등의 고정화 상태가 양호함을 나타내며, 도 4b는 1열의 8번째 프로브가 집적되지 않았음을 확인할 수 있는 결과이며, 도 4c는 집적된 프로브의 모양과 농도가 일정하지 않으며 집적 과정 중의 문제 등으로 인해 프로브가 여러 개의 프로브가 서로 뭉쳐져 혼합되었음을 확인할 수 있는 결과이다. 각 슬라이드에서 동일 양으로 집적된 프로브가 실제 고정화 후 집적된 프로브 농도에 차이가 있음을 알 수 있다. 즉, 스캐너로 분석한 결과 흰색의 스팟은 과포화 상태를 나타내며, 초록색은 흰색보다는 조금 낮은 농도로 집적되었음을 나타낸다.

<92> 도 5는 QC 프로브를 사용하지 않고 표적 프로브만을 고정화한 후, 슬라이드를 세척하기 전에 분석한 결과로서, 도 4과는 다르게 QC 프로브가 포함되지 않아 각 프로브 스팟에 대한 정보를 전혀 확인할 수 없다.

<93> 도 6는 QC 프로브와 표적 프로브를 슬라이드에 고정시킨 후, 세척 후의 슬라이드를 스캐너로 분석한 결과로서, 도 6a 및 6b는 마이코박테리움 첼로네의 표적 산물을 이용한 혼성화

반응 후의 결과이며, 도 6c는 중합효소연쇄반응에 대한 양성 대조군(positive control) 검출용 프로브에 대한 양성 대조군 산물의 혼성화 반응 결과이다. 1)은 세척 후, 혼성화 반응 전의 슬라이드를 535nm 파장에서 분석한 결과이며, 2)는 혼성화 반응 후의 슬라이드를 635nm 파장에서 분석한 그림이다. 도 6a-1)에서 QC 프로브의 고정화 여부와 모양 및 농도가 양호함을 확인하여, 6a-2)의 혼성화 반응 후의 결과에서도 표적 산물과 반응한 표적 프로브의 모양 및 농도 등의 상태가 양호함을 확인할 수 있다. 도 6b-1)는 세척 후, 혼성화 반응 전의 결과에의 경우로서 1열의 1번째 프로브는 아주 소량으로 혼성화 반응이 어려운 정도의 양이 슬라이드에 고정화되어 있음을 확인할 수 있으며 이러한 상태의 프로브들이 다수 존재함을 알 수 있다. 또한 1열과 3열에서 9행과 10행의 프로브들이 서로 뭉쳐져 모양이 불량함을 알 수 있다. 이러한 분석 결과로 6b-2)의 혼성화 반응 후의 결과에서도 동일한 양상을 확인하여 결과 해석에 이를 반영할 수 있다. 도 6c-1)에서는 1열의 12번째 프로브가 집적되지 않음을 확인할 수 있으며, 이러한 양상은 6c-2)의 혼성화 반응 후의 결과에서도 동일한 양상을 확인하여 결과 해석에 반영할 수 있다. 예컨대, 혼성화 반응 후 프로브가 확인되지 않은 결과가 표적 산물과 표적 프로브와의 혼성화 반응이 일어나지 않은 경우인지 또는 마이크로어레이 제조 시에 프로브의 고정화에 문제에 의한 결과인지를 확인할 수 있다. 따라서, 표적 프로브의 고정화 및 고정 상태에 문제가 있는 마이크로어레이를 제외하고 실험을 수행할 수 있으며, 프로브의 집적 과정 및 세척 과정상의 문제 등을 파악하여 안정된 반응 조건을 확립할 수 있다.

<94>

도 7은 실시예 11에서 제작된 프로브에 대한 결과로서, 도 7a와 b의 1)은 지지체에 고정시켜 세척한 후에 혼성화 반응전을 스캐너로 분석한 결과로서, 별도의 QC 프로브를 포함하지 않고 QC용 형광염료가 표지된 표적 프로브만을 이용하여 지지체 위 프로브의 실제 고정화 여부 및 상태를 확인하기 위한 것이며, 도 7a와 b의 2)는 마이코박테리움 투베르쿨로시스와 마이코

박테리움 포튜이툼의 표적 산물을 이용한 혼성화 반응 후의 분석 결과이다. 도 7a와 b의 1)은 지지체에 고정시킨후, 세척 후의 혼성화 반응 전의 결과로서, 별도의 QC 프로브를 포함하지 않고 형광염료가 표지된 표적 프로브 만을 이용한 경우로 지지체 위 프로브의 실제 고정화 여부 및 상태를 정확하게 확인할 수 있었다. 각 스팟의 모양과 크기가 동일하지 않으며 약간의 차이를 보임을 확인할 수 있으며, 농도는 각 스팟에 대해 양호함을 나타낸다. 도 7a의 2)는 마이코박테리움 투베르쿨로시스의 표적 염기서열과의 혼성화 반응후의 결과로서, MTB-10의 표적 프로브에 대해 혼성화 반응이 일어났음을 확인할 수 있으며, 도 7b의 2)는 마이코박테리움 포튜이툼의 표적 염기서열과의 혼성화 반응 결과로서, FOR-06의 표적 프로브에 대해 정확하게 혼성화 반응이 일어났음을 알 수 있다. 도 7의 결과에서, 형광으로 표지된 표적 프로브가 마이크로어레이의 품질 관리를 위한 QC 프로브로서의 사용이 가능하며, 또한 표적 프로브로서의 사용에도 어떠한 영향을 주지 않고 정확하게 반응이 일어남을 알 수 있었다. 따라서, 형광염료가 표지된 표적 프로브 만으로 표적 프로브의 고정화 및 표적 산물과의 혼성화 반응 실험을 수행할 수 있으며, 프로브의 집적 과정 및 세척 과정상의 문제 등의 파악과 간편한 조작 방법의 효과를 얻을 수 있었다.

【발명의 효과】

<95> 이상에서 살펴 본 바와 같이, 형광물질이 표지된 QC 프로브를 이용한 마이크로어레이의 품질검사 방법은, 한번의 스팟팅으로 실험하고자하는 표적 프로브의 고정화 상태와 마이크로어레이 마다의 각 프로브의 균일성, 모임 현상, 먼지, 도우넛 현상 등 스팟 모양 및 상태를 분석할 수 있다. QC 프로브 하나로 혼성화 반응뿐만 아니라, 지지체 표면 위의 표적 프로브를 간단하고 정확하게 검증할 수 있다. 즉, 기존의 혼성화 반응을 위한 프로브는 단지 표적 염기서열과 서로 상보적인 서열을 가지도록 고안되어 혼성화 반응에만 프로브가 이용되었지만, 본 발명

에서 고안 된 프로브는 기존의 일반 혼성화 반응은 물론 형광물질의 표지로 지지체에 부착된 프로브의 검증이 가능하며, 형광염료가 표지된 표적 프로브 만으로 표적 프로브의 고정화 및 표적 산물과의 혼성화 반응 실험을 수행할 수 있어 간편한 조작 방법의 효과를 얻을 수 있었다 . 혼성화 반응 위한 형광물질과 파장이 서로 다른 형광물질을 QC 프로브에 표지 하므로 혼성화 반응 후의 프로브 검증이 가능하다. 이에 실험 과정상의 문제점등을 파악할 수 있어 결과 분석을 더욱 정확하게 할 수 있다. 따라서 본 발명은 마이크로어레이의 프로브에 대한 고정화 여부 및 상태 대한 검사와 혼성화 반응 과정에서의 여러 가지 영향에 대한 검사 등 마이크로어레이의 제조 및 품질검사에 대해 경제적이며 신속·정확하게 효과적으로 사용될 수 있다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

표적 산물의 염기서열과 서로 상보적인 서열을 가지거나 또는 임의의 염기서열을 가지는 올리고뉴클레오티드에 형광물질을 표지하되, 상기 형광물질은 표적 산물에 표지된 형광물질과는 다른 여기/방출(excitation/emission) 파장을 가지는 것임을 특징으로 하는, 마이크로어레이의 품질검사 용 QC 프로브.

【청구항 2】

제1항에 있어서, 형광물질은 올리고뉴클레오티드의 염기 서열중 하나 또는 그 이상의 자리에 표지되며, 그 위치는 QC 프로브의 3' 말단, 5' 말단 또는 중간인 것을 특징으로 하는 QC 프로브.

【청구항 3】

제1항에 있어서, 프로브의 염기서열과 형광물질 사이에 스페이서(spacer)를 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 QC 프로브.

【청구항 4】

제1항에 있어서, 형광물질은 피레닌(Pyrene), 싸이아닌 2 (Cyanine 2), GFP, 칼세인(Calcein), FITC, 알렉사(Alexa 488), FAM, 플로레센 클로로트리아지닐(Fluorescein Chlorotriazinyl), 플로레센(Fluorescein), 로다민(Rhodamine 110), 오레건 그린(Oregon Green), 마그네슘 그린(Magnesium Green), 칼슘 그린(Calcium Green), JOE, 싸이아닌 3(Cyanine 3), 테트라메틸로다민(Tetramethylrhodamine), TRITC, TAMRA, 로다민 팔로이딘(Rhodamine Phalloidin), 피로닌 Y(Pyronin Y), 리싸민(Lissamine), ROX, 칼슘크림션(Calcium

Crimson), 텍사스 레드(Texas Red), 나일 레드(Nile Red), 싸이아닌 5(Cyanine 5) 및 티아디카복시아닌(Thiadicarbocyanine)으로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상의 물질인 것을 특징으로 하는 QC 프로브.

【청구항 5】

제1항에 있어서, 표적 산물의 염기서열과 서로 상보적인 서열을 가지는 올리고뉴클레오티드의 염기 서열 및 스페이서 염기 중 하나 또는 그 이상의 자리에 형광물질이 표지되어 표적 프로브의 기능을 함께 가지는 것을 특징으로 하는 QC 프로브.

【청구항 6】

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 QC 프로브와 표적 프로브를 일정 비율로 혼합하거나 제5항의 QC 프로브를 단독으로 마이크로어레이의 지지체에 고정하는 것을 특징으로 하는 마이크로어레이의 제조방법.

【청구항 7】

제6항에 있어서, QC 프로브 및 표적 프로브는 cDNA, 올리고뉴클레오티드, 펩타이드 또는 단백질인 것을 특징으로 하는 제조방법.

【청구항 8】

제6항에 있어서, QC 프로브와 표적 프로브가 하나의 스팟에 동시에 고정되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

【청구항 9】

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 QC 프로브와 표적 프로브 또는 제5항의 QC 프로브가 고정되어 있는 마이크로어레이.

【청구항 10】

제9항에 있어서, QC 프로브와 표적 프로브가 하나의 스팟에 동시에 고정된 것을 특징으로 하는 마이크로어레이.

【청구항 11】

제9항에 있어서, QC 프로브는 표적 프로브와 동일한 염기서열을 가지지만 서로 다른 파장을 가지는 형광물질로 표지화한 것을 특징으로 하는 마이크로어레이.

【청구항 12】

제9항의 마이크로어레이를 이용하여 프로브의 고정화 상태 및/또는 표적산물과의 결합 반응을 확인하는 것을 특징으로 하는 마이크로어레이의 품질검사 방법.

【청구항 13】

제12항에 있어서, 표적 프로브와 표적 산물과의 혼성화 반응 전 또는 후에 QC 프로브에 표지된 형광물질에서 발생하는 형광신호를 스캐닝하여 프로브의 고정화 상태를 확인하는 것을 특징으로 하는 마이크로어레이의 품질검사 방법.

【청구항 14】

제12항에 있어서, 표적 프로브와 표적 산물과의 혼성화 반응 후에 표적 프로브에 표지된 형광물질에서 발생하는 형광신호를 스캐닝하여 프로브와 표적산물과의 결합반응을 확인하는 것을 특징으로 하는 마이크로어레이의 품질검사 방법.

【청구항 15】

제12항에 있어서, 서로 다른 파장을 가지는 형광물질들로 표지화된 하나의 프로브로 프로브의 고정화 상태 검증과 표적 산물과의 혼성화 반응 검증을 함께 수행하는 것을 특징으로 하는 마이크로어레이의 품질검사 방법.

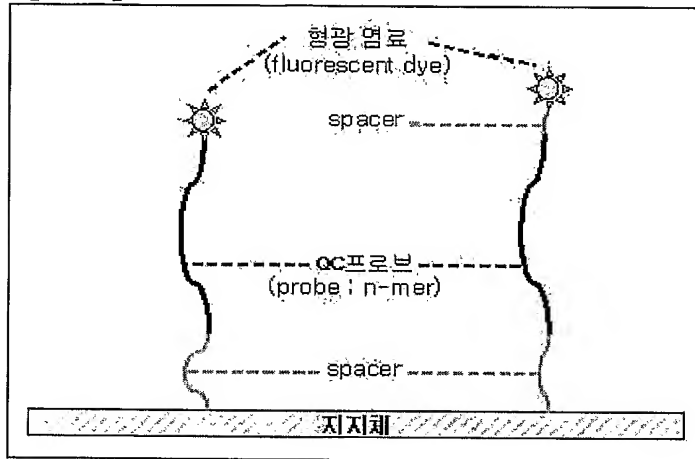
【청구항 16】

서열번호 1 내지 2에서 선택된 마이코박테리아 균주 감별을 위한 마이코박테리아 속 특이적인 ITS(Internal Transcribed Spacer) 염기서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드.

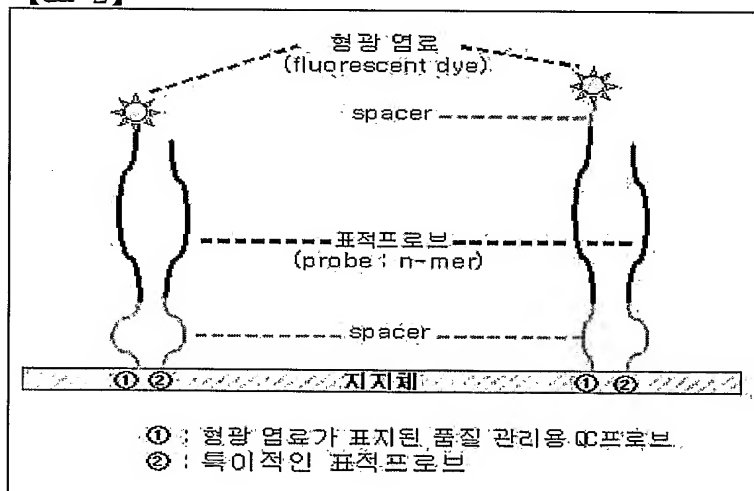


【도면】

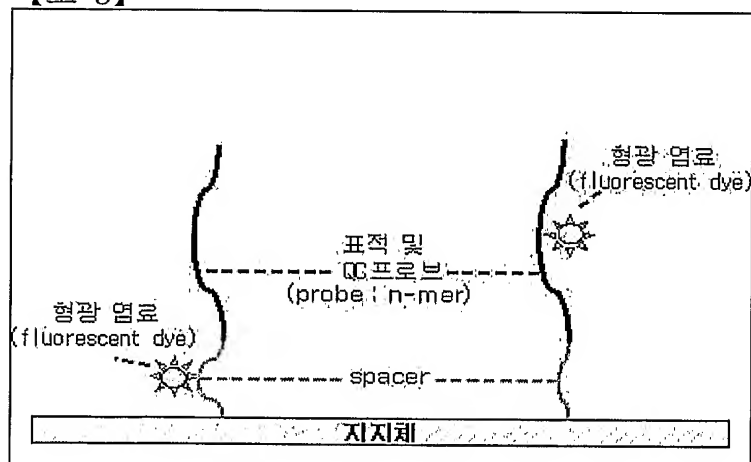
【도 1】



【도 2】

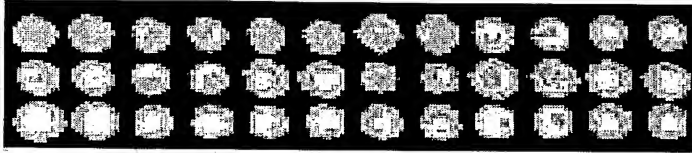


【도 3】

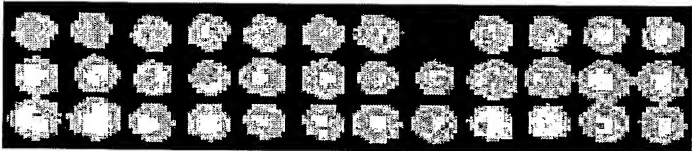




【도 4a】



【도 4b】



【도 4c】



【도 4d】

슬라이드에 집적된 프로브의 배열 모식도

1열	①①	②②	③③	④④	⑤⑤	⑥⑥
2열	①①	②②	③③	④④	⑤⑤	⑥⑥
3열	①①	②②	③③	④④	⑤⑤	⑥⑥

①PAN-01	②MTB-02	③MAC-03	④FOR-04	⑤CHE-04	⑥INT-01
---------	---------	---------	---------	---------	---------

【도 5】

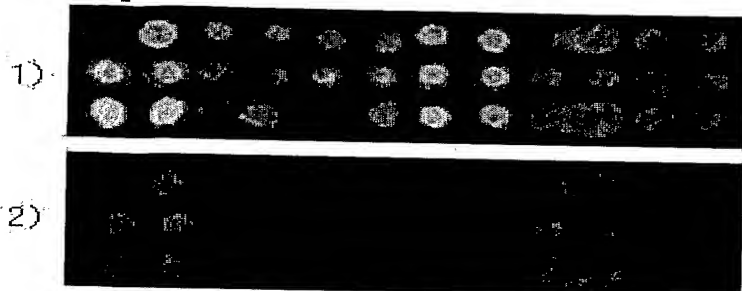


【도 6a】

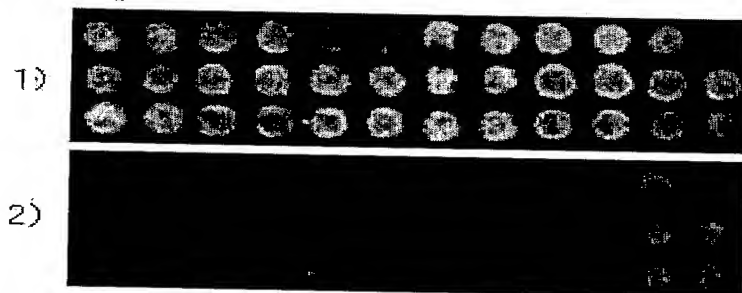


2)

【도 6b】



【도 6c】



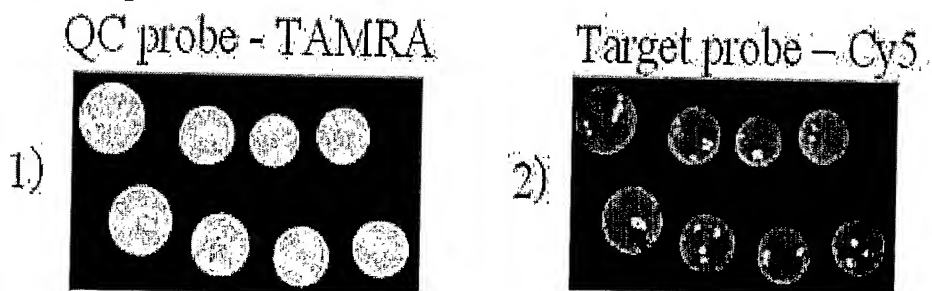
【도 6d】

슬라이드에 집적된 프로브의 배열 모식도

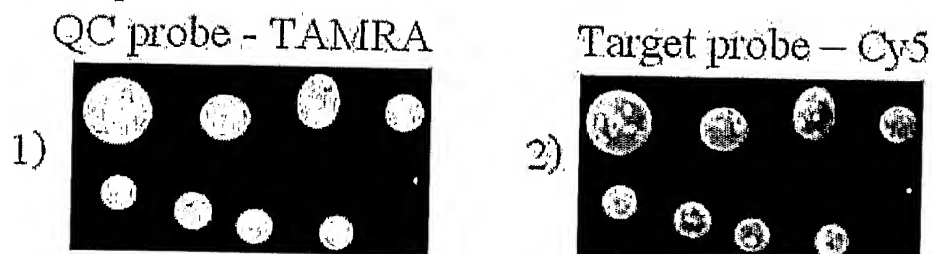
1열	①①	②②	③③	④④	⑤⑤	⑥⑥
2열	①①	②②	③③	④④	⑤⑤	⑥⑥
3열	①①	②②	③③	④④	⑤⑤	⑥⑥

①PAN-01	②MTB-02	③MAC-03	④FOR-04	⑤CHE-04	⑥INT-01
---------	---------	---------	---------	---------	---------

【도 7a】



【도 7b】



【서열목록】

<110> KIM, Chul Min <120> Microarray comprising QC probes and method for
 fabricating the same <130> GN013755 <160> 10 <170> KopatentIn 1.71
 <210> 1 <211> 20 <212> DNA <213> Mycobacteria <400> 1 gcttttctaag
 gagcaccacg 20 <210> 2 <211>
 20 <212> DNA <213> Mycobacteria <400> 2 gcttttctaag gagcaccatt
 20 <210> 3 <211> 20 <212> DNA <213> Mycobacteria <400> 3 tggatagtg
 ttgcgagcat 20 <210> 4 <211>
 20 <212> DNA <213> TB complex <400> 4 tgggtggggcg taggccgtga
 20 <210> 5 <211> 15 <212> DNA <213> M.avium-M.intracellulare <400> 5
 ctcggtcgaa ccgtg 15 <210>
 6 <211> 20 <212> DNA <213> M. fortuitum <400> 6 caaacttttt tgactgccag
 20 <210> 7 <211> 20 <212> DNA <213> M. chelonae <400> 7 gtagtcggca
 aaacgtcgga 20 <210> 8 <211>
 17 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> Internal control <400>
 8 cagttatatg gatgatg 17 <210>
 9 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> QC probe
 <400> 9 tttttttttt tttttttttt tttttttttt
 30 <210> 10 <211> 35 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 QC probe <400> 10 tttttttttt ttttttggtg ggggtgtggtg tttga

